



INSTYTUT
OGRODNICTWA

Zakład Ochrony Roślin Warzywnych
Pracownia Fitopatologii Warzywniczej

KIŁA KAPUSTY

MONITOROWANIE I DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Plasmodiophora brassicae

W UPRAWACH ROŚLIN KAPUSTOWATYCH

Autorzy:

prof. dr hab. Józef Robak
mgr Anna Czubatka
mgr Agnieszka Czajka

Opracowanie redakcyjne: dr Ludwika Kawa-Miszczak

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.13:**

„Monitorowanie i diagnostyka molekularna *Plasmodiophora brassicae* w uprawach roślin kapustowatych”

Programu Wieloletniego:

„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodniczej w celu zapewnienia
wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodniczych oraz zachowania
bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2013

Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Kolekcja i przechowywanie inokulum *P. brassicae*
4. Diagnozowanie próbek glebowych na obecność *P. brassicae*
 - a) metody testów biologicznych
 - b) metody testów molekularnych
5. Identyfikacja patotypów *P. brassicae* i ich zmienność biologiczna
6. Badania podatności wybranych gatunków i odmian roślin żywicielskich z rodzaju *Brassica* na określone patotypy *P. brassicae*
7. Występowanie i zagrożenie pól przez *P. brassicae* – sprawcę kiły kapusty, ich geograficzne rozmieszczenie w Polsce oraz aktualne możliwości określania stopnia zasiedlania gleby przez *P. brassicae*
8. Literatura

1. Wstęp

Sprawca kiły kapusty, najgroźniejszej choroby roślin kapustowatych, *Plasmodiophora brassicae*, jest organizmem biotroficznym pochodzenia glebowego, powodującym znaczne straty ekonomiczne w uprawach warzyw kapustnych oraz na towarowych plantacjach rzepaków w Polsce i na świecie (Robak i in. 2009). Epidemiczny charakter występowania tej choroby staje się czynnikiem limitującym uprawę roślin kapustowatych. Główną przyczyną tego zjawiska jest monokulturowy charakter uprawy i nieprzestrzeganie podstawowych zasad zmianowania. Sprawca choroby, *P. brassicae*, jest organizmem endemicznie występującym na glebach torfowych (torfy niskie), a także na eksploatowanych torfowiskach wysokich do produkcji substratów torfowych, przeznaczonych do produkcji rozsąd warzyw kapustnych (Robak 2011). Sprawca choroby jest patogenem glebowym, porażającym i wyniszczającym system korzeniowy roślin żywicielskich. Zasiedlając glebę zarodniki przetrwalnikowe *P. brassicae* pod wpływem wydzielin korzeniowych roślin żywicielskich wytwarzają zarodniki pływkowe, które po wnikięciu do komórek włosnikowych i komórek korzeni wypełniają je treścią plasmodium. Komórki systemu korzeniowego tracą wówczas swoją funkcję życiową pobierania składników pokarmowych i wody, powiększając swoją wielkość i liczbę (hipertrofia i hiperplasia) tworząc galasowate wyrośla. Porażone rośliny w szybkim czasie więdną i zamierają. Warunkami sprzyjającymi rozwojowi choroby jest wysoka wilgotność gleby, kwaśny odczyn pH poniżej 6,0 oraz temperatura 22-25°C (Nowicki 1984, Robak 1991). Patogen ten posiada około 200 gatunków roślin żywicielskich, m.in. pospolite chwasty z rodziny *Brassicae*, np.: tobołki polne, tasznik pospolity, gęsiówka piaskowa, gorczyca polna (Robak 1981). Zarodniki przetrwalnikowe *P. brassicae* mają zdolność przetrwania w glebie do 6-8 lat bez obecności roślin żywicielskich. Zarodniki infekcyjne - pływki, mają charakter zoospor, są ruchliwe w środowisku wodnym, dlatego sprawca choroby ma dużą zdolność rozprzestrzeniania się z wodą na duże obszary poprzez systemy melioracyjne.

2. Cel zadania

Stworzenie systemu monitorowania kiły kapusty z zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej i testów biologicznych do wykrywania w glebie tego agrofaga, pozwoli zapobiec niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu się tej choroby w Polsce.

Prowadzone dotychczas w Polsce i na świecie badania nad możliwością wykrywania obecności sprawcy choroby w glebie nie dają pełnej informacji o stopniu zagrożenia chorobą (Wallenhammar 2012). Dotychczasowe techniki biologiczne i molekularne pozwalają stwierdzić obecność sprawcy choroby w glebie na poziomie przybliżonego progu szkodliwości i zdolności infekcyjnej *P. brassicae*, który może się różnić w zależności od typu gleby, zawartości materii organicznej, odczynu gleby i jej temperatury oraz podatności rośliny żywicielskiej.

Nowe możliwości określenia stopnia zasiedlenia gleby przez *P. brassicae* i wyznaczanie progu zagrożenia można uzyskać tylko przy zastosowaniu nowoczesnych technik molekularnych. Na obecnym etapie rozwoju tych technik w Polsce i na świecie, istnieje możliwość zastosowania techniki nested-PCR do wykrywania obecności czynnika chorobotwórczego, zaś do jego ilościowego określenia (stopnia zasiedlenia) wykorzystywana jest technika real-time PCR. Modyfikacją i stosowaniem techniki nested-PCR zajmujemy się w naszym Instytucie od kilkunastu lat, natomiast techniką real-time od 2013 roku. Istniejące dotychczas na świecie opracowania i techniki metody real-time w oznaczaniu DNA *P. brassicae* w próbkach gleby są technicznie bardzo trudne i jeszcze nie w pełni opracowane. Metoda ta dla ilościowego oznaczania *P. brassicae* w glebach wymaga autorskiej modyfikacji i doskonalenia – prace są kontynuowane w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach.

3. Kolekcja i przechowywanie inokulum *P. brassicae*

Inokulum sprawcy choroby, *P. brassicae*, powinno być gromadzone i przechowywane w taki sposób, aby zarodniki przetrwalnikowe czynnika chorobotwórczego zachowały możliwie najwyższą zdolność infekcyjną. Większość badaczy proponuje gromadzenie i przechowywanie inokulum w postaci wyrośli zebranych z porażonych roślin żywicielskich lub w postaci dokładnie oczyszczonej i zagęszczonej wodnej zawiesiny, i przechowywanie w temperaturze 0-5°C (Dixon 1976, 1977). Buczacki i wsp. (1975) polecają gromadzenie i przechowywanie w postaci zakażonej ziemi i wysiewanie do niej kapusty pekińskiej odmiany Grannat, podatnej na wszystkie formy biologiczne *P. brassicae*.

Na podstawie własnych badań (Robak 1991) i sugestii innych autorów, przyjęto do gromadzenia i przechowywania inokulum metodę próbek glebowych z fragmentami wyrośli korzeniowych i przechowywanie ich w szczelnych opakowaniach foliowych w temperaturze od -1°C do 0°C oraz w postaci umytych wyrośli korzeniowych, szczelnie zapakowanych w worki foliowe przechowywane w temperaturze -18°C. Metody te pozwalają na przechowywanie próbek gleby przez okres 2-3 lat bez obniżania żywotności zarodników przetrwalnikowych.

4. Diagnozowanie próbek glebowych na obecność *P. brassicae*

a) metody testów biologicznych

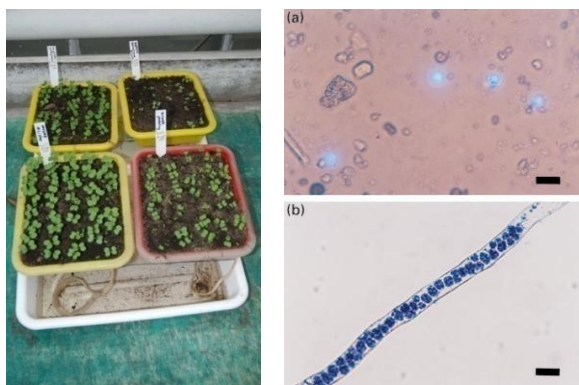
Test biologiczny, wazonowy w szklarni

Dla potrzeb testów biologicznych trzeba pobrać próbki glebowe analogicznie jak do analiz potrzeb nawozowych gleby, do głębokości 10 cm. Jedna próba reprezentacyjna o objętości ok. 5-7 litrów stanowi mieszaninę próbek gleby pobranej z 15 punktów z pola o powierzchni do 0,5 ha, z miejsc, gdzie występowała choroba. Pobrane próbki gleby umieszcza się w szczelnych torbach foliowych z zamieszczoną etykietą, zawierającą informacje nt. lokalizacji pola, położenie geograficzne lub punkty pobierania określone za pomocą urządzenia GPS, z adresem pocztowym, telefonem i historią upraw na danym polu. Do czasu założenia testów (kilka tygodni do 3 miesięcy) próbki gleby można przechowywać w chłodni w temperaturze 0°C.

Dostarczane próbki ziemi z poszczególnych gospodarstw pochodzą bezpośrednio od właścicieli gospodarstw, instruktorów Ośrodków Doradztwa Rolniczego i Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa, zespołów producentów rzepaków Zakładów Tłuszczowych w Polsce.

Określoną serię próbek glebowych przeznaczoną do diagnozowania umieszcza się w pojemnikach plastikowych (7x15x30 cm) o objętości 3 litrów, w 4 powtórzeniach (jeden pojemnik jedno powtórzenie). Dla podwyższenia stopnia czułości (konduktywności) wykrywania *P. brassicae* metodą testu biologicznego, do próbek pochodzących z gleb mineralnych należy dodać sterylne substratu torfowego Raditorf® (sterylizowanego termicznie 90°C / 20 minut) w stosunku objętościowym jak 1:3 (substrat torfowy: próbka glebowa). Przy analizie gleb torfowych (torfy niskie) i substratów torfowych, dodawanie substratu torfowego jest niepożądane.

Do tak przygotowanej próbki glebowej wysiać nasiona rośliny testowej z rodzaju *Brassica rapa* odm. Grannat uznaną jak dotąd w literaturze naukowej za podatną na wszystkie patotypy *P. brassicae*. Wzrost roślin odbywa się w klimatyzowanych kabinach szklarniowych w temperaturze 21-24°C i stałej ilości światła (doświetlanie do 14 godzin) przez okres 30-35 dni. Po tym czasie dokonać obserwacji systemu korzeniowego roślin na obecność symptomów choroby. Na tych samych roślinach w fazie początkowej, tj. w fazie 3-4 dniowych siewek, można dokonywać wstępnej obserwacji mikroskopowej komórek włosnikowych na obecność plazmodiów, pod powiększeniem x100. W przypadku wyszukania kilku komórek włosnikowych systemu korzeniowego rośliny testowej z obecnością plazmodiów *P. brassicae* istnieją podstawy do wstępnej diagnozy obecności sprawcy choroby (Fot. 1).

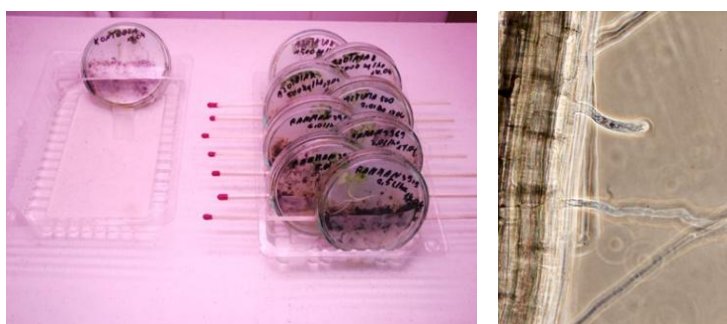


Fot. 1. Test biologiczny próbek glebowych na obecność *P. brassicae*, wykonywany w pojemnikach plastikowych w szklarni.

Z prawej: plazmodia *P. brassicae* w komórce włosnikowej, widoczne pod mikroskopem.

Test biologiczny w mikropróbkach glebowych, metodą miniaturyzacji na szalkach Petriego

Do przeprowadzenia testu można użyć szalki Petriego o średnicy 9 cm, w których umieszcza się mikropróbki badanej gleby przygotowanej analogicznie jak opisano wcześniej dla zwiększenia konduktywności badanych próbek gleby mineralnej. Mikropróbkę o pojemności ok. 10 ml należy umieścić na wilgotnej bibule. Bezpośrednio nad próbką badanej gleby umieszczamy nasiona rośliny testowej w ilości 15-20 szt. (*Brassica rapa* odm. Grannat). Wzrost roślin odbywa się w szklarni lub innym pomieszczeniu z zapewnieniem warunków stałego dostępu światła (doświetlanie przez 14 godzin) i temperaturze powietrza 22-24°C. Symptomy choroby można określać na komórkach włosnikowych pod mikroskopem, na siewkach 3-4 dniowych. Siewki delikatnie wyjmować z gleby, dokładnie opłukać w wodzie i barwić korzenie przez 5 sekund w błękitie anilinowym. Analiza komórek włosnikowych na obecność plazmodiów *P. brassicae* analogicznie jak podano wcześniej.



Fot. 2. Zmodyfikowany test biologiczny – szalkowy na obecność plazmodiów w komórkach włosnikowych rośliny testowej.

Z prawej: komórki włosnikowe wypełnione plasmodiami *P. brassicae*

Wyniki badań pozwoliły ocenić przydatność badanych metod biologicznych, zarówno metody wazonowej w szklarni, jak i na makropróbkach glebowych, z analizą mikroskopową komórek włosnikowych po 4-5 dniach i jednocześnie makroskopową obserwacją po 35 dniach na obecność objawów choroby na korzeniach w postaci wyrosli korzeniowych. Liczne testy szalkowe wykazały, że metoda ta może być przydatna tylko do wstępnej oceny na obecność sprawcy kiły kapusty w badanych próbkach gleby.

Stwierdziliśmy, że przy zbyt niskim stopniu zagęszczenia zarodników w badanych próbkach glebowych i w małej objętości gleby (ok. 10 ml) nie uzyskiwaliśmy powtarzalności wyników testów, pozwalających na określenie obecności włosników zawierających plasmodia *P. brassicae*. Zasiedlone przez plasmodia komórki włosnikowe są bardzo skrócone, przybierają buławkowaty kształt. Wewnątrz tych włosników można nawet bez barwienia korzeni dostrzec pod mikroskopem typowe symptomy choroby – okrągłe plasmodia.

Tabela 1. Porównanie metody biologicznej i molekularnej (nested-PCR) w wykrywaniu obecności *P. brassicae* w glebie mineralnej i organicznej, z zastosowaniem testu biologicznego i testu molekularnego.

Stopień zagęszczenia zarodników <i>P. brassicae</i> w 1 ml gleby	Test biologiczny		Test molekularny nested - PCR	
	Substrat torfowy ogrodniczy	Gleba mineralna	Substrat torfowy ogrodniczy	Gleba mineralna
10^2	-	-	-	-
10^3	+	-	(+ -)	(+ -)
10^4	+	(+ -)	+	+
10^5	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+
10^7	+	+	+	+
10^8	+	+	+	+
Kontrola (gleba sterylizowana termicznie)	-	-	-	-

(+) wykryto *P. brassicae* (-) nie wykryto *P. brassicae* (+ -) wykryto tylko w jednym teście

Na podstawie testów biologicznych, w substracie torfowym widoczne objawy choroby w postaci uformowanych wyrosli korzeniowych na roślinie testowej wykryto już przy zagęszczeniu zarodników *P. brassicae* 10^3 w 1 ml podłoża. W glebie mineralnej widoczne objawy choroby wykryto dopiero przy zagęszczeniu 10^5 .

W teście molekularnym nested-PCR obecność *P. brassicae* stwierdzono w substracie torfowym przy zagęszczeniu 10^4 i w wyższych.

b) metody testów molekularnych

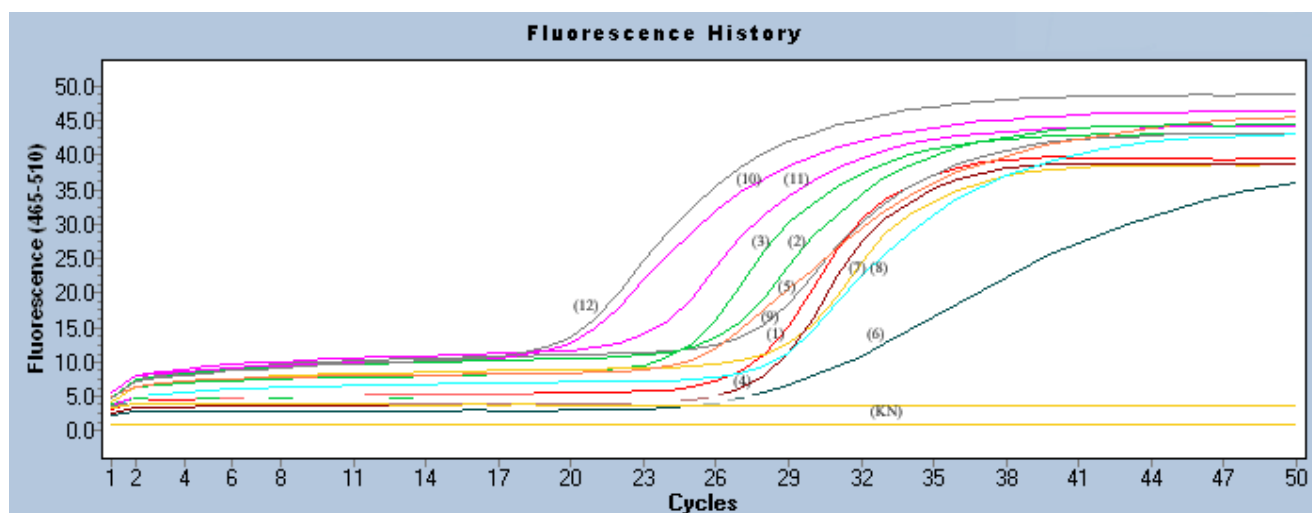
Badania w celu określenia stopnia zagęszczenia *P. brassicae* w badanych próbkach gleby nową techniką molekularną **Real-Time PCR**. Z najnowszych badań prowadzonych m.in. w Szwecji (Wallanhamar 2012) wynika, że ekstrakcja DNA i analiza genetyczna *P. brassicae* z próbek glebowych tą metodą jest możliwa i pozwala na ilościowe określenie stopnia zasiedlenia *P. brassicae* w glebie i podjęcie decyzji o uprawie roślin kapustowatych i zastosowaniu metod zapobiegających chorobie.

Diagnozowanie próbek glebowych na obecność *P. brassicae* metodą molekularną nested-PCR i real-time PCR

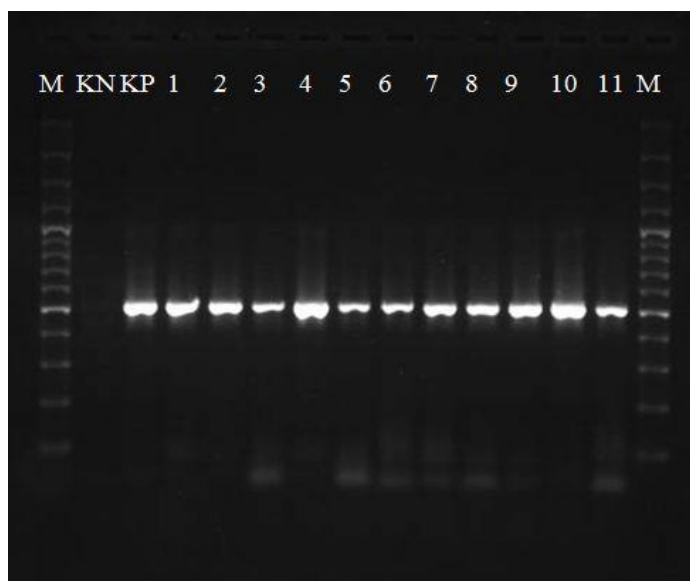
Testy molekularne z użyciem wyizolowanego z gleby DNA przeprowadzono przy pomocy dwóch metod: nested-PCR i real-time PCR według ustalonej metodyki.

Wyniki przeprowadzonej reakcji nested-PCR przedstawia fot. 3. Metoda real-time stwarza nowe możliwości precyzyjnego, ilościowego określenia zarodników *P. brassicae* w poszczególnych próbkach gleby. Krzywe amplifikacji badanych 12 prób przedstawiono na rys. 1.

Wszystkie wykonane testy wykazały obecność *P. brassicae* we wszystkich badanych próbkach (tab. 2).



Rys. 1. Krzywe amplifikacji 12 badanych próbek glebowych (numeracja w nawiasach odpowiada numerom próbek z tabeli 2; KN – kontrola negatywna – DNA wyizolowane z korzenia kapusty bez *P. brassicae*).



Fot. 3. Produkty reakcji nested-PCR w 11 badanych próbkach glebowych

M – Marker wielkości DNA Gene Ruler™ 100bp; KN – ziemia autoklawowana 2x – kontrola negatywna; KP – kontrola pozytywna - gleba z zarodnikami kiły kapusty występująca na polu doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach; 1-Gleba z Pszczyny; 2-Gleba z Wadowic; 3-Gleba z Dębna; 4-Gleba z SHRO Kamień; 5-Gleba z Braniewa; 6-Gleba z Nowej Rudy; 7-Gleba z Ząbkowic Śląskich; 8-Gleba z Gołdapi; 9-Gleba z Sokołowa Podlaskiego; 10-Glebia z Błonie; 11-Glebia z Łaszczowa; M. Marker wielkości DNA Gene Ruler™ 100bp

Tabela 2. Diagnozowanie próbek gleby na obecność *P. brassicae* metodą testu biologicznego i testu molekularnego; Skierniewice 2013

Badana próbka gleby (miejscowość - roślina uprawiana)	Test biologiczny wazonowy	Testy molekularne	
		Nested PCR	Real-time PCR* (zagęszczenie zarodników)
1. Gleba z Pszczyny - spod uprawy kapusty białej	+	+	1,58*10 ⁴
2. Gleba z Wadowic - spod uprawy kapusty białej	+	+	4,82*10 ⁵
3. Dębno (Gorzów WLKP) – spod uprawy rzepaku ozimego	+	+	1,52*10 ⁶
4. SHRO Kamień (Kalisz) – spod uprawy kalafiora	+	+	1,16*10 ⁴
5. Braniewo (Elbląg) - spod uprawy kapusty białej	+	+	2,36*10 ⁵
6. Nowa Ruda (Wałbrzych) - spod uprawy kapusty białej	+	+	4,51*10 ³
7. Ząbkowice Śląskie (Wałbrzych) – spod uprawy kapusty włoskiej	+	+	8,32*10 ³
8. Gołdap (Suwałki) - spod uprawy kapusty białej	+	+	5,56*10 ³
9. Sokołów Podlaski - spod uprawy kapusty białej	+	+	1,69*10 ⁵
10. Błonie (Warszawa) - spod uprawy kapusty białej	+	+	2,23*10 ⁷
11. Łaszczów (Zamość) - spod uprawy kalafiora	+	+	4,45*10 ⁶
12. Mielec (Rzeszów) - spod uprawy kalafiora	+	+	2,88*10 ⁷

+ stwierdzono obecność *P. brassicae* w badanej próbce gleby

- nie stwierdzono obecności *P. brassicae*

* **stopień zasiedlenia zarodników *P. brassicae* w wyizolowanych próbkach gleby**

5. Identyfikacja patotypów *P. brassicae* i ich zmienność biologiczna

Sprawca kiły kapusty *P. brassicae* nie jest gatunkiem jednorodnym genetycznie. Dotychczasowe badania Nowickiego (1984) i Robaka (1991) wykazały, że na terenie Polski występuje od kilku do kilkunastu patotypów (ras) *P. brassicae* i na przestrzeni lat następuje jego dynamiczna zmienność biologiczna (powstawanie nowych patotypów). Na terenie USA występują tylko 3 patotypy *P. brassicae* (Dobson i in. 1983). Dotychczasowe techniki określania patotypów sprawcy choroby polegają na testach biologicznych z użyciem zestawu roślin testowych wg. systemu Williamsa (1966) dwóch odmian kapusty białej głowiastej: Jersey Queen (JQ) i Bagder Shipper (BS) oraz dwóch odmian brukwi: Laurention (L) i Wilhelmsburger (W). W prowadzonych testach biologicznych może zachodzić zjawisko braku pełnej reakcji podatności całej populacji danego gatunku i odmiany rośliny testowej (100%). Dolną granicą uznania danego gatunku rośliny testowej za podatną według Williamsa (1966) jest porażenie równe i wyższe 75% (określenie w języku angielskim „cut point off”). Jeżeli uzyskujemy porażenie poniżej 75% danego gatunku rośliny testowej, wówczas określamy to mieszaniną patotypów. W takich przypadkach w celu uzyskania czystości patotypów (ras) należy wykonać

kilkukrotne pasażowanie danych izolatów *P. brassicae*, używając tych samych gatunków roślin testowych (Robak 1991).

Za pomocą tego systemu można teoretycznie wyodrębnić 16 patotypów *P. brassicae* oznaczonych numerami od 1 do 16. Nasiona roślin testowych uzyskano z banku genów CrGC Madison Wisconsin USA, reprodukcja nasion odbywa się we własnym zakresie w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach.

Tabela 3. Zestaw roślin testowych do określania ras *P. brassicae*

Roślina testowa	Numer patotypu rasy															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. Jersey Queen	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
2. Bagder Shipper	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
3. Laurention	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
4. Wilhelmsburger	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+



Fot. 4. Test wazonowy w szklarni

6. Badania podatności wybranych gatunków i odmian roślin żywicielskich z rodzaju *Brassica* na określone patotypy *P. brassicae*

Badania nad stopniem podatności roślin z rodziny *Brassicaceae* na najczęściej występujące patotypy (rasy) *P. brassicae* wyodrębnione w przeprowadzonych badaniach: **Pb 2, Pb 4, Pb 7.**

Do testów wzorcowych określających stopień podatności na wyizolowane patotypy *P. brassicae* wyznaczono 7 gatunków i odmian roślin kapustowatych:

1. Gorczyca biała – podatna
2. Rzepak ozimy odm. Pamela – podatna
3. Rzepak ozimy odm. Allister F1 – odporna
4. Rzepak ozimy odm. Mendel F1 – odporna
5. Rzodkiew oleista odm. Ramosa – odporna
6. Rzodkiew czarna odm. Murzynka – odporna
7. Kapusta głowiasta odm. Kilaton F1 – odporna

Badania przeprowadzono w warunkach mikropoletkowych w kręgach betonowych o średnicy 1m². Każdą z roślin testowych wysiano w liczbie 50 nasion / poletko, do ziemi zawierającej poszczególne patotypy o zagęszczeniu 10⁷ / 1 ml gleby zarodników przetrwalnikowych.

Po 7 tygodniach rośliny wyrwano i oceniono stopień porażenia korzeni przez *P. brassicae*.

Tabela 4. Procent roślin testowych, z rodziny *Brassicaceae* porażonych przez określone patotypy *P. brassicae*.

Roślina testowa	Patotyp Pb2	Patotyp Pb4	Patotyp Pb7
1. Gorczyca biała – podatna	100	95	100
2. Rzepak ozimy odm. Pamela – podatna	95	90	90
3. Rzepak ozimy odm. Allister F – odporna	5	5	5
4. Rzepak ozimy odm. Mendel F1 – odporna	5	10	10
5. Rzodkiew oleista odm. Ramosa – odporna	10	10	5
6. Rzodkiew czarna odm. Murzynka – odporna	10	10	5
7. Kapusta głowiasta odm. Kilaton F1 – odporna	5	15	10

Podatne gatunki badanych roślin: gorczyca biała oraz rzepak ozimy odmiana Pamela wykazały pełną podatność na trzy patotypy *P. brassicae*. Rzepak odporny odmiana Allister F1 wykazał najwyższy stopień odporności poziomej na 3 badane rasy *P. brassicae*.

Dotychczasowe badania wykazują, że dostępne obecnie odmiany warzyw kapustnych i rzepaków ozimych uznane za odporne nie wykazują pełnej odporności na poszczególne patotypy sprawcy choroby, potwierdzają to również badania innych autorów (ustne informacje) i doniesienia z praktyki.

7. Występowanie i zagrożenie pól przez *P. brassicae* – sprawcę kily kapusty, ich geograficzne rozmieszczenie w Polsce oraz aktualne możliwości określania stopnia zasiedlania gleby przez *P. brassicae*



Rys. 2. Mapa Polski. Geograficzne rozmieszczenie *P. brassicae* w Polsce z wyszczególnieniem występujących patotypów (ras) w latach 2011-2013.

(6) – oznacza mieszaninę patotypów

Tabela 5. Geograficzne rozmieszczenie lokalizacji występowania *P. brassicae* w Polsce na podstawie testowanych próbek gleby pobranych z różnych miejscowości i upraw roślin żywicielskich, określenie współrzędnych techniką GPS, w latach 2011-2013:

Miejscowość	Lokalizacja pobrania próbek wg systemu GPS	Województwo	Patotyp (rasa) <i>P. brassicae</i> wg. Williamsa
1. Buszyno Polanin pow. Koszalin pr nr 99	54°11'58.48"N 16°42'14.77"E	zachodniopomorskie	9
2. Buszynowo Polanin pow. Koszalin pr nr 95	54°12'04.43"N 16°42'12.44"E	zachodniopomorskie	9 (7)*
3. Karsibór pr. nr 1	53°21'12.24"N 16°24'41.35"E	zachodniopomorskie	11
4. Karsibór pr. nr 2	53°22'12.24"N 16°26'41.36"E	zachodniopomorskie	11
5. Dębno	52°44'20"N 14°41'52"E	zachodniopomorskie	7
6. Wandowo	53°37'42.75"N 19°03'48.57"E	pomorskie	1 (4)*
7. Dubiel	53°47'44.14"N 19°00'59.35"E	pomorskie	4
8. Kwidzyna pr. nr 1	53°47'11.98"N 18°55'00.67"E	pomorskie	2
9. Braniewo	54°23'N 19°50'E	warmińsko-mazurskie	7
10. Kamień	51°49'20"N 18°13'50"E	wielkopolskie	7
11. Sokołów Podlaski	52°24'24"N 22°14'47"E	mazowieckie	2 (4)*
12. Błonie	52°12'N 20°37'E	mazowieckie	2, 4 (6)*
13. Wałbrzych dzielnica Lubiechów	50°47'05.96"N 16°15'57.75"E	dolnośląskie	4
14. Nowa Ruda	50°34'45.17"N 16°30'05.25"E	dolnośląskie	4
15. Pszczyna	49°59'38.96"N 18°57'09.13"E	śląskie	4, 7 *
16. Wadowice	49° 53' 8" N 19° 29' 28" E	małopolskie	4, 4 (6)*
17. Łaszczów	50°32'N 23°44'E	lubelskie	7, 7 (6)*
18. Lebiechów gm. Terespol	52°01'12.10"N 23°35'42.06"E	lubelskie	8
19. Mielec	50°17'30"N 21°26'00"E	podkarpackie	7

* patotypy występujące w mieszaninach

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań nad zmiennością biologiczną *Plasmodiophora brassicae* stwierdzono, że na terenie Polski występuje duże zróżnicowanie biologiczne populacji *P. brassicae*. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania Nowickiego (1984) i Robaka (1991). Do chwili obecnej udało się określić nową rasę (patotyp) PB 11, która pojawiła się po 2000 roku w Polsce na plantacjach rzepaku ozimego. Należy sądzić, że kilkuletnia uprawa w Polsce odmian roślin kapustowatych odpornych na *P. brassicae* (w tym

kapusty głowiastej, kalafiorów, kapusty pekińskiej i rzepaków ozimych) mogła wyrzeźić presję selekcyjną i pojawienie się nowego patotypu.

Potwierdzają to również badania IHAR, oddział w Poznaniu, gdzie stwierdzono przełamanie się odporności u odpornej odmiany rzepaku ozimego Mendel F1 (ustna informacja) i doniesienia producentów warzyw i rzepaku ozimego.

Największe zróżnicowanie patotypów (ras) *P. brassicae* występuje w rejonach intensywnej uprawy wielkoobszarowej rzepaku ozimego, województwa: warmińsko-mazurskie, pomorskie, zachodniopomorskie, dolnośląskie, wielkopolskie.

Wstępne badania oznaczenia stopnia zasiedlenia próbek gleby metodą Real-time wykazały, że na polach w większości badanych miejscowości stopień zasiedlenia jest bardzo wysoki i wynosi 10^5 do 10^7 zarodników przetrwalnikowych *P. brassicae*.

Według doniesień Ośrodków Doradztwa Rolniczego, doniesień rolników i własnych obserwacji można stwierdzić, że corocznie porażonych plantacji warzyw kapustnych jest ok. 30%, a plantacji wielkotowarowych rzepaku ozimego szacunkowo 40%.



Fot. 5. Plantacja kalafiorów zniszczona przez *P. brassicae*



Fot. 6. Plantacja brokołu zniszczona przez *P. brassicae*



Fot. 7 i 8. Wielkoobszarowa produkcja rzepaku ozimego zniszczona w 100% przez *P. brassicae* - Województwo Zachodniopomorskie

LITERATURA

- Buczacki S.T., Toxopeus H, Mattush P., Johnston T.D., Dixon G.R, Hobolth L.A. 1975. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*, proposal for attempted rationalization through an international approach. Trans Br. mycol. Soc., 65: 295-303.
- Dixon G.R. 1976. Method used in Western Europe and in the USA for testing *Brassicae* seedling resistance to club root (*Plasmodiophora brassicae*) Plant Path, 25:129-134.
- Dixon G.R. 1977. Interaction between host cultivar and *Plasmodiophora brassicae* population. Proc. of "Woronin+ 100" International Conference on Clubroot, Madison, Wisconsin 5-7 Sept. 1977: 93-96.
- Dobson R., Robak J., Gabrielson R.L. 1983. Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in Washington, Oregon and California. Pl. Dis, 67:269-271.
- Nowicki B. 1984. Zróżnicowanie biologiczne *Plasmodiophora brassicae* Wor. w Polsce oraz podatność uprawianych roślin krzyżowych na wykryte patotypy grzyba. SGGW-AR Warszawa, 34: 76 s.
- Robak J. 1981. Występowanie kiły kapusty na glebach torfowych oraz jej zwalczanie metodami chemicznymi. Praca doktorska, Instytut Warzywnictwa w Skierniewicach. Maszynopis, 123 s.
- Robak J. 1991. Zmienność patotypów *Plasmodiophora brassicae* Wor. występujących w Polsce i ich patogeniczność w stosunku do odmian i linii hodowlanych *Brassica oleracea*. Praca habilitacyjna nr 6. Instytut Warzywnictwa, Skierniewice, 61 s.
- Robak J., Gidelska A. 2009. Epidemiologia i nowe możliwości zwalczania *Plasmodiophora brassicae* Wor. - sprawcy kiły kapusty na roślinach kapustowatych w Polsce (Epidemiology and new possibility of control of *Plasmodiophora brassicae* causal agent of clubroot of cruciferous crop in Poland). Prog. Plant Protection/Pos. Ochr. Roślin 49 (1): 268-274.
- Robak J., Gidelska A. 2011. Ochrona warzyw kapustowatych przed chorobami w zróżnicowanym systemie produkcji (Protection of brassicae crops against disease causal agents in a sustainable production system). Prog. Plant Prot/Post. Ochr. Roślin 51 (1): 298-306.
- Wallenhammar A.C. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR and the influence of soil physiochemical parameters on disease development. 6th International Symposium on Brassica and 18th Crucifer Genetic Workshop, Catania (Italy) 12-16 November, p. 262.
- Williams P.H. 1966. A system for determination of races *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. Phytopathology 56: 624-626.